

氏 名	落 合 美 佐
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)
学 位 番 号	第 4528 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当者
学 位 論 文 名	2種の耐熱性糖質分解酵素の構造と機能に関する研究 (Structure and function of two thermostable glycosidases)
論文審査委員	主 査 教 授 谷 口 誠 副主査 教 授 田 中 俊 雄 副主査 教 授 平 澤 栄 次

論 文 内 容 の 要 旨

酵素による有用物質生産のニーズは高まっている。目的に合致した酵素を手に入れる手段として、酵素の構造と機能の相関を理解したうえで酵素を改変することにより、テラーメイド酵素を創出することが、注目されている。そのような酵素創出を視野に入れ、本研究では、極めてユニークな酵素化学的特性をもつ2種の耐熱性糖質分解酵素における機能の構造的基盤を明らかにすることを目的とした。

Bacillus sp. SAM1606由来 -グルコシダーゼは、耐熱性で、基質特異性の最も広い -グルコシダーゼの1つである。本酵素と基質特異性のまったく異なるオリゴ-1,6-グルコシダーゼとのアミノ酸配列比較に基づき、本酵素に変異を導入した酵素の加水分解反応における基質特異性および転移反応における作用特異性について詳細に検討した。その結果、Gly273 Proの置換が、加水分解反応においてはトレハロースに対する親和性を大きく低下させること、転移反応においては位置特異性の変化および反応初速度の著しい上昇をもたらすことを明らかにした。

一方、*Saccharopolyspora rectibvirgula*由来 -ガラクトシダーゼは、1分子あたり8つもの2価金属イオンを結合するマルチメタル酵素であり、これらの2価金属イオンが活性発現および耐熱性獲得に重要であった。機能と構造の相関を検討するために、遺伝子をクローン化し一次構造を明らかにした。本酵素の金属イオン結合部位の1つにおいては、*E. coli*由来の *lacZ* -ガラクトシダーゼにおけるMg²⁺イオンの結合しているアミノ酸残基が保存されており、変異導入により、この部位はMn²⁺イオンの結合部位であることを明らかにした。さらに、本酵素は、これまでに知られている -ガラクトシダーゼとのアミノ酸配列比較から、その活性中心をもつドメイン中に既知のどのタンパク質とも相同性のない192アミノ酸残基からなる挿入配列があった。この挿入配列の機能を明らかにするため、欠失および挿入変異型酵素を作製し、それぞれの酵素化学的性質を検討した。その結果、この配列は活性発現や金属イオン結合には直接関わらないが、酵素の4次構造の形成に密接に関与することを明らかにした。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

近年、新しい生理機能を備えた糖質の開発に大きな関心が寄せられている。同時に、そのような糖質を大量生産する技術の確立にも注目が集まっている。そこで、それらを一気に成就する手段の一つとして、既存の酵素を改変したテラーメイド酵素の活用が考えられる。本論文は、そのような酵素創出を視野に入れ、極めてユニークな酵素化学的特性をもつ2種の耐熱性糖質分解酵素の構造改変と機能変化に関する基礎的な研究を取りまとめたものである。

著者はまず、耐熱性で、基質特異性の最も広い -グルコシダーゼの1つである *Bacillus* sp. SAM1606 由来

-グルコシダーゼに着目し、基質特異性のまったく異なるオリゴ-1,6-グルコシダーゼとの一次構造比較に基づき、種々の変異を導入した。それらの中で、Gly273 Proの置換は加水分解反応におけるトレハロースに対する親和性を大きく低下させ、転移反応における位置特異性を変化させるとともに反応初速度を著しく上昇させることを明らかにした。次に、*Saccharopolyspora rectivirgula*由来 -ガラクトシダーゼに着目し、本酵素は1分子あたり8つもの2価金属イオンを要求するマルチメタル酵素であり、いずれの金属イオンも活性発現および耐熱性獲得に重要であることを明らかにした。また、本酵素の遺伝子をクローン化して一次構造を決定し、*E. coli*由来の *lacZ* -ガラクトシダーゼとの一次構造比較に基づく変異導入により、 Mn^{2+} イオンの一つが結合している部位を明らかにした。さらに、本酵素にはユニークな挿入配列が存在することを見だし、それは4次構造の形成に密接に関与していることも明らかにした。

以上のように著者は、2種の糖質分解酵素において、変異を導入するという手法によって、機能発現の構造的基盤に関する重要な知見を得た。本論文には、テラーメイド酵素による新規機能性糖質の開発は現実のものになる可能性を示唆するだけでなく、広くタンパク質研究に寄与する数多くの成果が含まれており、博士(理学)の学位授与に値するものと審査した。